

环境致癌加合物 MNU-DNA 的高效液相色谱分离与质谱鉴别*

龙耀庭** 陆妙琴 江崇球***

(中国科学院生态环境研究中心 北京 100085)

[摘要] 本文报道环境致癌物 MNU 与 DNA 形成的 MNU-DNA 加合物的 HPLC 与 MS 的分离、鉴别结果。加合物在水解后分析。HPLC 法通过保留时间及各洗提物的 UV 吸收光谱在线检测, 筛选出感兴趣的目标化合物(N^7 -MG, O^6 -MG), 再通过质谱(EIMS 及 FABMS)鉴定, 文中还讨论了某些有关的质谱碎裂特征及温度对 MNU-DNA 加合物水解效率的影响。

关键词: 加合物 MNU-DNA 高效液相色谱 质谱

1 引言

人体暴露于化学致癌物之后, 造成 DNA 碱基损伤, 最终可以导致肿瘤的发生, 这已成了致癌研究的中心议题。Perera 提出用 DNA 加合物作为测量人体暴露在致癌物中的生物计量物(biological dosimeters), 另外, DNA 加合物的结构可以提供有关 DNA 修饰过程中致癌物代谢的重要线索^[1]。但是, 代谢后大多表现为由 DNA 上富电子部位的加合。有关分析致癌物-DNA 加合物方面, 已经发展了若干灵敏的方法, 如免疫法、荧光法、 ^{32}P -后标记法等, 其灵敏度都非常之高, 像 ^{32}P 后标记甚至可以检测出每 10^{10} 核苷酸中一个加合物的水平。可惜, 这些方法缺少结构信息, 所以在结构辨认上不很确切。近来 in vitro/in vivo 试验表明: 对于致癌性烷化剂, 尽管它有可能在 DNA 碱基鸟嘌呤的 N^7 -和 O^6 -部位都可以发生加合, 但是, O^6 -部位的甲基化在生理毒性上远比 N^7 -部位甲基化更为重要。 O^6 -部位的甲基化修饰(修饰物为 O^6 -MG)可造成碱基错误配对, 是使细胞中毒或死亡的主要原因。因此, 如何有效地分离和鉴别 O^6 -与 N^7 -MG 这两个鸟嘌呤的位置异构体, 对于从分子水平研究有关环境诱变剂的致癌毒理机制有着十分重要的意义。质谱法在研究这种修饰方面, 已成了其它方法不能代替的一种手段^[2]。其主要原因是质谱法在提供极少量样品的分子量和分子结构信息方面, 有着突出的优点, 从而在环境致癌物研

1994 年 3 月 17 日收

* 国家自然科学基金资助课题

** 通讯联系人

*** 现在山东师范大学

究方面日益受到重视^[3]。本文用 HPLC 与快速原子轰击质谱法 (FABMS) 相结合, 研究 MNU 与 DNA 相互作用形成的加合物中的 O^6 -MG 和 N^7 -MG。

2 实验材料与方法

2.1 材料: [^3H]MNU, 比活性 1.0 Ci/mmol, 美国 New England Nuclear 公司产品。其它试剂为国产分析纯商品。

2.2 仪器设备: HP-1090M HPLC 高效液相色谱仪, 带有二极管阵列检测器, RP-C18 反相色谱柱 (0.45×25cm); KYKY-1 双聚焦快速原子轰击质谱仪, 配置氦离子枪快速原子轰击源, 以及配有电子轰击源的 VG-7070E 双聚焦磁式质谱仪。

2.3 加合及水解反应操作条件: 50mg 的小牛胸腺 DNA 溶解在 10mL 的 0.2mol/L 二甲胂酸钠, 1mmol/L EDTA (pH7.4) 溶液中, 加入 1mCi 的 [^3H]MNU (1.0 Ci/mmol), 在 37℃ 反应 4 小时, 烷基化的 DNA 用 2.5~3 倍的冷乙醇沉淀, 然后将沉淀再溶解于 10mL 的磷酸缓冲液 (0.1mol/L 氯化钠, 10mmol/L 柠檬酸钠, 10mmol/L 磷酸钾, pH7.4) 密封于安培瓶内, 在 80℃ 加热 16 小时。作用完毕后用缓冲液 A (1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris/HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 透析 24 小时, 再用缓冲液 B (10mmol/L Tris/HCl, 1mmol/L EDTA, pH 8.0) 于 4℃ 透析 4 小时。含有 O^6 -[^3HMe] Gua 及 N^7 -[^3HMe] Gua 的 DNA 溶液保存在 -20℃ 的冰箱中。用 HPLC 进行两者的分离与馏份收集, 馏份 I 中含有 75~80% 标记的 O^6 -[^3HMe] Gua, 每毫克 DNA 约 20000~30000cpm, 每 100cpm 相等于 150fmol O^6 -MeGua, 馏份 II 中则含有近 90% 的 N^7 -MeGua。

2.4 HPLC 流动相组成为 0.02M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - CH_3OH 。梯度淋洗条件为 20 分钟内甲醇由 1% 升至 60%。

2.5 质谱鉴别 电子轰击质谱法 (EIMS): 固体粉末直接进样, 70eV 下电离样品, 电离室温度 240℃; FABMS: 用甘油及卞基醇作底物。快速原子轰击氦离子枪工作电压为 3000V。工作温度为 150℃。扫描速度为 50~800/分。

3 实验结果与讨论

加合物 MNU-DNA 的水解产物的 HPLC 分离结果见图 1。液闪放射性强度测定表明, 峰 I 和峰 II 为新生的 MNU-DNA 碱基鸟嘌呤加合物, 是苯乙烯氧化物与 DNA 加成的主要加合碱基组分。按峰面积估计, 约占 DNA 水解后碱基的 90% 左右。标样及放射性测量表明, 峰 I 和峰 II 分别为 O^6 -MG 和 N^7 -MG (HPLC 谱图的保留时间分别为 12 分和 14 分)。

HPLC 的流出物二极管阵列检测器紫外扫描峰 I 与峰 II 的 UV 吸收谱线见图 2。UV

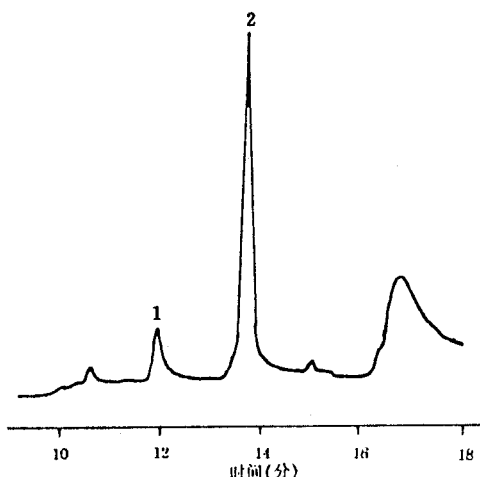


图 1 加合物 MNU-DNA 的水解产物的 HPLC 分离结果

结果表明,峰 I 的 UV 吸收曲线相似于 O^6 -MG,而峰 II 则相似于 N^7 -MG。放射性标记测量表明, O^6 -MG 和 N^7 -MG 的分离比较完全。UV 吸收谱图能提供一定的鉴别结果。但是,考虑到 UV 光谱是分子的电子能级间的跃迁,无法提供精细结构差异,为了更确切的证实峰 I 与峰 II 的分子结构,我们进一步用质谱法进行核实。

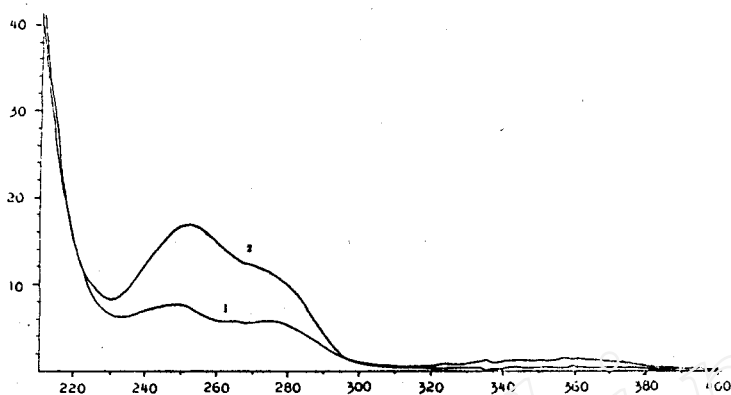


图 2 图 1 中加合物 MNU-DNA 的水解产物的 HPLC 峰 I (1) 与峰 II (2) 的 UV 吸收谱图

经 HPLC 馏份收集后, O^6 -MG 与 N^7 -MG 的普通电子轰击谱示于图 3。 O^6 -MG 碎裂途径可以解释如下:分子离子 m/z 165 失去 $-H_2NCN$ 碎片,产生 m/z 123 碎片离子峰,后者存在两个可能的碎裂途径,一个途径是失去 $-HCN$ (27amu),生成 m/z 96 离子峰,继而失去 $-CO$ (28amu),得到 m/z 68 碎片离子,并进一步失去 HCN 或 CH_3 ,分别生成 m/z 41 或 m/z 53 碎片离子峰。另一途径为失去 $-CH_3O$ 后生成 m/z 92 碎片离子峰。

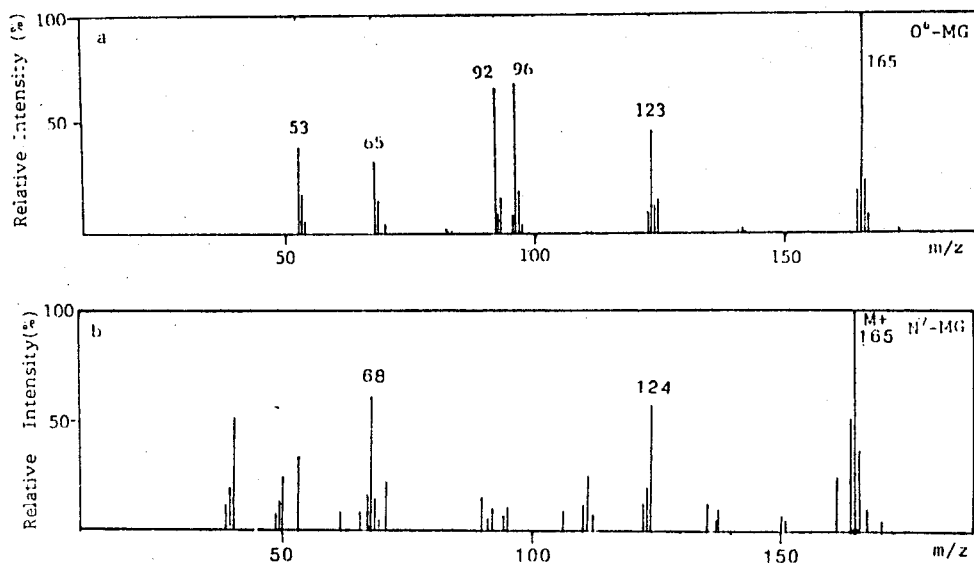
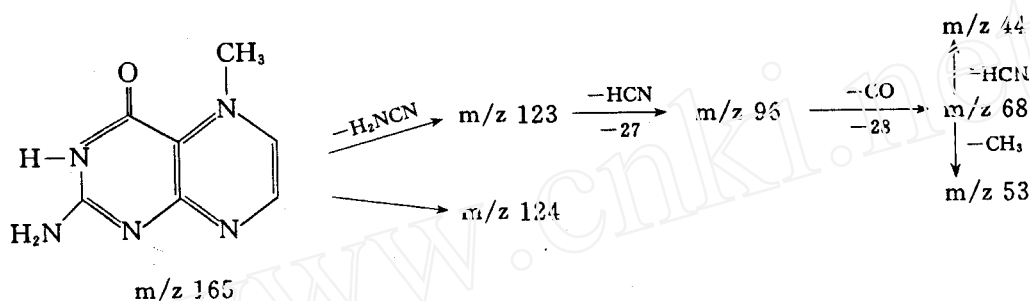
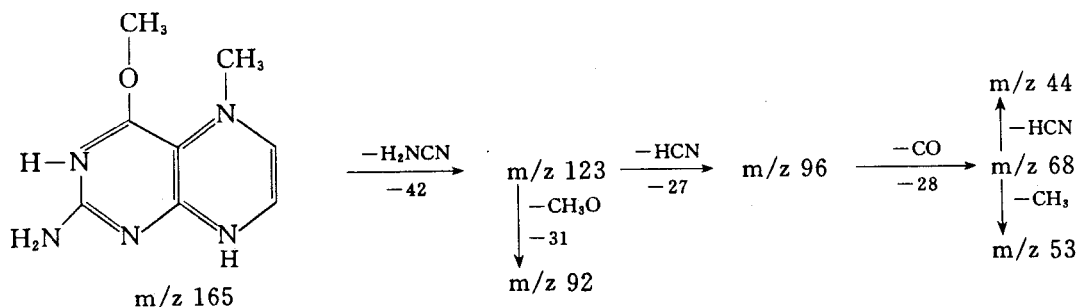


图 3 电子轰击质谱图 a) O^6 -MG b) N^7 -MG

O⁶-MG 碎裂途径示于式(1), N⁷-MG 碎裂途径见式(2)。



对碱基修饰物的碎裂模式的分析不难看出, N⁷-MG、O⁶-MG 和鸟嘌呤的碎裂途径具有大致相同的模式, 只是当 CH₃ 取代部位不同时, 其碎片离子质量数呈现某种差别。鸟嘌呤及其衍生物的质谱碎裂机制, 可以假设归纳为按图 4 进行碎裂, 即首先按①①'弧线与分子相交的键发生两键断裂, 然后按②②'与分子相交的两键位置发生断裂, 继而在分子碎片剩下的部分与③③'弧线相交的键发生进一步碎裂。应该说, 这种断裂模式存在的假设对于产生共轭的杂环结构是合理的。

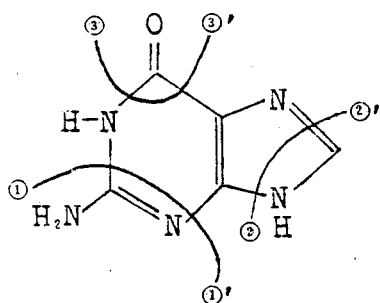


图4 碎裂示意图

EIMS 对甲基化试剂修饰后的 DNA 水解产物—甲基鸟嘌呤的前处理及谱图测定有某些限制。而快速原子轰击质谱法(FABMS)在样品要

求上比 EIMS 有许多简便之处。为了比较, 本工作同时对 O⁶-MG 与 N⁷-MG 的 HPLC 馏份收集样品进行了 FAB 质谱的测定, 其谱图示于图 5。FAB 质谱图可获得 [M+1]⁺ 准分子离子峰 (m/z 166), 失去 [H₂NCN+H] 后也获得 m/z 123 碎片峰。但 FAB 质谱图的准

分子离子峰相对强度比 EIMS 获得的分子离子峰强。

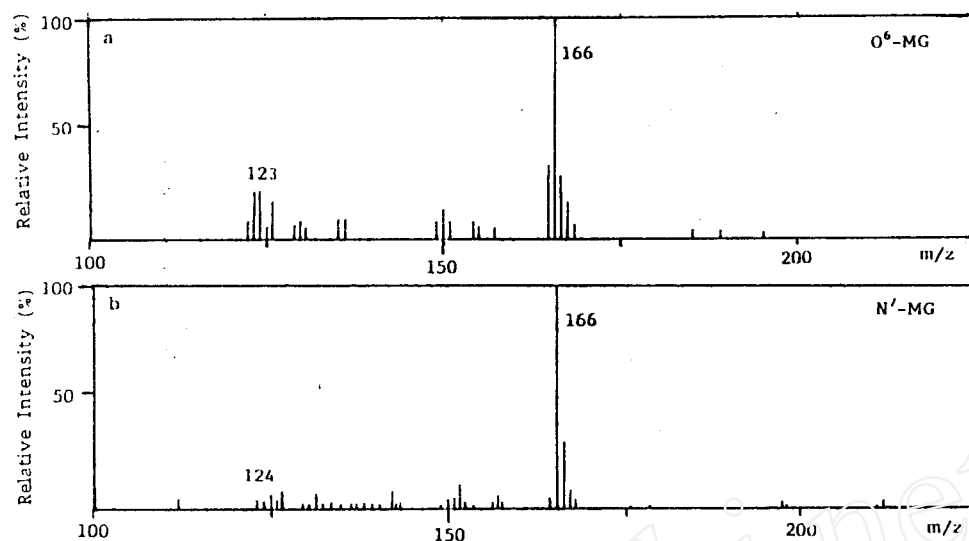


图 5 FAB 质谱图

a) O⁶-MG b) N⁷-MG

实验表明,卞基醇作底物可取得与甘油底物相同结果,但是,甘油可获得较大的灵敏度。事实上,DNA 碱基在快速原子轰击过程中可以发生缔合现象,这种缔合现象与氢键强度有关^[4]。甘油具有三个羟基(—OH)基团,在形成氢键的能力方面比卞基醇有利,故能获得比卞基醇更好的结果。

MNU 与 DNA 碱基中的鸟嘌呤生成加成物时,主要是以共价键形式在其活性部位相结合^[3],这种结合属于加成反应,会受到环境因素的影响。

表 1 温度对 DNA 碱基中 O⁶-MG 和 N⁷-MG 的产率影响

温度(℃)	产率(%) *	
	O ⁶ -MG	N ⁷ -MG
20	0.30	10
25	0.32	11
30	0.33	11
37	0.33	12
41	0.35	12

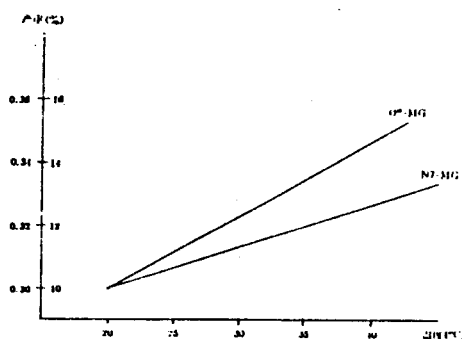


图 6 温度对 DNA 碱基中 O⁶-MG 和 N⁷-MG 产率的影响

表 1 及图 6 给出了温度对 DNA 碱基中 O⁶-，与 N⁷-位结合生成 O⁶-MG 和 N⁷-MG 产率的影响。温度升高有利于 O⁶-MG 的生成,明显大于 N⁷-MG 的增长。可能的原因是,随着温度的升高,DNA 双螺旋的结合程度有某种程度的改变,使得螺旋内部的碱基

活性部位更加暴露在攻击性亲电子基团面前,从而促进了 DNA 上的鸟嘌呤碱基的被修饰程度。这对于处在正常体温以上的机体易于受到环境致癌物的侵害的理解可能有一定的参考意义。

4 小结

本文通过 HPLC 和 MS 结合酸性降解的方法,分离鉴别了 MNU-DNA 加合物。实验结果表明,温度对于具有重要致突(癌)作用的 O⁶-MG 的生成具有正相关作用。本文给出了可能的鸟嘌呤碱基及其衍生物的断裂模型。

感谢曹恩华副教授在样品制备方面给予的帮助。

参 考 文 献

- 1 Eadie J *et al.* Nature 1984, 308: 201-203
- 2 Evelyn A Waldstein *et al.* Mutation Research, 1982 95:405-416
- 3 龙耀庭. 环境科学进展, 1993 1(4):20-41
- 4 Long Yaoting *et al.* in: Recent Advance in Cancer Chemistry (Dai Qianhuan, Morigan, Anshell A, Zhen Qingying eds), Vegley-Science Press, Huraberg, 1993

Mass Spectrometric Identification and HPLC Separation of Environmental Carcinogen MNU-DNA Adducts

Long Yaoting**, Lu Miaoqin, Jian Congqiu

(Research Center for Eco-Environmental Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Received 1994-03-17

Abstract

The experimental results of analysis of adducts formed from environmental carcinogenic compound MNU-DNA by combination of HPLC and FABMS are presented in this paper. The analysis of the adducts is carried out after hydrolysis of MNU-DNA adduct. The HPLC effluents are screened with their UV spectra by DAD and the effluents of interest O⁶-MG and N⁷-MG are collected for MS analysis. The hydrolytical efficiency of DNA and MS fragmental paths of DNA bases adducts are also discussed.

Key Words: adduct MNU-DNA, HPLC, MS.